7 月 July
2020, 63(7): 817 – 824
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.07.005

小菜蛾基因组中内源性逆转录病毒元件 PxERV 的发现与特征分析

王 月[1,2,3], 卢 丛[1,2,3], 刘天生[1,2,3], 陈韶萍[1,2,3], 尤民生[1,2,3,*]

(1. 福建农林大学应用生态研究所, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002; 2. 福建农林大学, 教育部害虫生态防控国际合作联合实验室, 福州 350002; 3. 福建农林大学, 农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室, 福州 350002)

摘要:【目的】内源性逆转录病毒(endogenous retroviruses, ERVs)是一类在宿主基因组中世代留存的有类似病毒结构的序列元件。本研究在通过前期小菜蛾 *Plutella xylostella* 精巢转录组分析发现一个小菜蛾内源性逆转录病毒元件 PxERV 的基础上,探究该逆转录病毒元件的序列特征及侵染活性,为探明内源性逆转录病毒对小菜蛾的影响奠定基础。【方法】利用生物信息学方法分析鉴定了 PxERV 在小菜蛾基因组上的序列及结构特点,并用基因克隆和测序得到 PxERV 的 env 基因序列;进一步通过 MEGA6 软件构建了昆虫 env 基因编码的氨基酸序列与核型多角体病毒包膜糖蛋白的系统发育树。利用 qPCR 技术检测了 env 基因在小菜蛾 G88 品系不同发育时期虫体和精巢中的表达模式及 FZ 品系成虫和 G88 品系的成虫和幼虫中 env 基因拷贝数的变化。利用 CRISPR/Cas9 介导小菜蛾 G88 品系中 env 基因突变,检测 PxERV 的独立复制活性。【结果】PxERV 有 LTR-*pol*-*env*-LTR 结构,其 env 基因与果蝇 *Drosophila buzzatii* 逆转座子 osvaldo 和粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 内源性逆转录病毒 Ted 的 env 基因进化关系较近。PxERV 的 env 基因在小菜蛾 G88 品系雄成虫精巢中特异性高表达,env 基因的拷贝数在小菜蛾 FZ 品系中的低于在 G88 品系中的,但在不同发育时期的 G88 品系中没有差异。G88 品系多代自交,突变型 env 基因在小菜蛾基因组上不断减少,直至完全恢复野生型 env 基因。【结论】内源性逆转录病毒元件 PxERV 在小菜蛾世代间存在独立复制活性,但在小菜蛾发育过程中不会独立复制。这种病毒元件可能通过小菜蛾雄性生殖系统实现侵染活性,但侵染机理还需进一步探究。

关键词: 小菜蛾; 基因组; 内源性逆转录病毒; env 基因; 系统发育; qPCR
中图分类号: Q963 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)07-0817-08

Discovery and characterization of an endogenous retroviral element, PxERV, in the genome of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

WANG Yue[1,2,3], LU Cong[1,2,3], LIU Tian-Sheng[1,2,3], CHEN Shao-Ping[1,2,3], YOU Min-Sheng[1,2,3,*]
(1. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Joint International Research Laboratory of Ecological Pest Control, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Key Laboratory of Integrated Pest Management for Fujian-Taiwan Crops, Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

基金项目: 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT170164)
作者简介: 王月, 女, 1988 年 4 月生, 山东淄博人, 博士研究生, 研究实习员, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: ygnw486@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: msyou@fafu.edu.cn
收稿日期 Received: 2020-02-03; 接受日期 Accepted: 2020-04-09

Abstract:【Aim】Endogenous retroviruses (ERVs) are retrovirus-like elements that have been fixed in the host genome for generations. This study aims to characterize the sequence characteristics and infectious ability of an endogenous retroviral element, PxERV, in the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella*, which we found during an analysis of its testis transcriptome, so as to provide a basis for addressing the role of ERVs in *P. xylostella*.【Methods】The sequence and structural characteristics of PxERV in the *P. xylostella* genome were analyzed and identified using bioinformatics methods. The env gene sequence of PxERV was cloned and sequenced. A phylogenetic tree of amino acid sequences coded by env genes and envelope glycoproteins of nucleopolyhedroviruses of insects was constructed using MEGA6 software. The expression levels of env gene in the body and testis of strain G88 of *P. xylostella* at different developmental stages and the copy numbers of env gene in the adult of strain FZ and the adult and larva of strain G88 of *P. xylostella* were detected using qPCR technology. The independent replication activity of the PxERV in strain G88 was detected by using CRISPR/Cas9 to mediate the mutation of env gene.【Results】PxERV exhibits a structure of LTR-*pol*-*env*-LTR. The env gene of PxERV was evolutionarily related to the env genes of the retrotransposon osvaldo in *Drosophila buzzatii* and the endogenous retrovirus Ted in *Trichoplusia ni*. The expression level of env gene of PxERV was specifically high in male adult testis of strain G88, and its copy number was lower in strain FZ than in strain G88 and showed no difference among different developmental stages of strain G88. After multiple generations of self-crossing in strain G88, the mutant env gene was gradually reduced in the *P. xylostella* genome until the wild-type env gene was completely restored.【Conclusion】PxERV shows the independent replication activity between generations of *P. xylostella*, but no independent replication activity in different developmental stages of the same generation of *P. xylostella*. We assume that PxERV might complete inter-generational infection through the male reproductive system of *P. xylostella*, with further studies required to address the mechanism associated with its infection.

Key words: *Plutella xylostella*; genome; endogenous retrovirus; env gene; phylogeny; qPCR

内源性逆转录病毒(endogenous retroviruses, ERVs)被认为是生物进化过程中外源逆转录病毒在宿主基因组中的残余序列,能够整合进宿主生殖系统,所以在宿主基因组中世代存留(Löwer *et al.*, 1996)。内源性逆转录病毒基因组两端有与外源逆转录病毒类似的长末端重复序列(long terminal repeat sequence, LTRs),中间有 1~3 个主要的开放阅读框(*gag*, *pol* 和 *env*)编码病毒复制所需的结构和功能蛋白:*gag* 编码衣壳蛋白;*pol* 编码蛋白酶、逆转录酶、RNA 酶 H 和整合酶;*env* 编码产物用于细胞受体的识别和病毒的侵入(Misseri *et al.*, 2004)。通常认为,昆虫内源性逆转录病毒的侵染能力跟 *env* 基因的表达相关(Teysset *et al.*, 1998)。

在多种脊椎动物和非脊椎动物基因组中都发现了内源性逆转录病毒序列,比如鼠、牛、果蝇等(Terzian *et al.*, 2001; Garcia-Etxebarria and Jugo, 2010, 2016),人类基因组中此类序列约占 8%(Belshaw *et al.*, 2004),家蚕基因组中也报道了 256 条内源性逆转录病毒序列(Feng *et al.*, 2018)。由于结构相似,内源性逆转录病毒一度被认为是 LTR 转座子,后继发现果蝇中 *gypsy* 和 *ZAM* 元件具有侵染活性(Kim *et al.*, 1994; Leblanc *et al.*, 2000),此类序列元件被划定为内源性逆转录病毒。但是国际病毒分类学委员会把脊椎动物内源性逆转录病毒归于逆转录病毒科(*Retroviridae*),却把昆虫内源性逆转录病毒归于转座病毒科(*Metaviridae*)(Fablet, 2014)。经典的脊椎动物内源性逆转录病毒在宿主正常的生物学过程及疾病发生过程中可能有着重要的作用(Wang *et al.*, 2013; Bustamante Rivera *et al.*, 2017)。在昆虫学研究领域,黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (*gypsy*, *17-6*, *297*, *ZAM*, *Idefix*, *nomad*, *tirant*)、黑果蝇 *Drosophila virilis*(*Tv*1)、嗜凤梨果蝇 *Drosophila ananassae*(*tom*)、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*(*Ted*)和地中海实蝇 *Ceratitis capitata*(*yoyo*)等物种发现了多种内源性逆转录病毒元件(Terzian *et al.*, 2001),甚至 *gypsy* 和 *ZAM* 的活性周期都有了详细报道(Kim *et al.*, 1994; Leblanc *et al.*, 2000),但内源性逆转录病毒对宿主的生物学意义

却一无所知。

小菜蛾 *Plutella xylostella* 是世界范围内分布非常广泛的鳞翅目害虫，已经对许多重要的十字花科经济作物造成毁灭性的破坏（Furlong *et al*., 2013）。在小菜蛾精巢发育的全转录组（数据未发表）研究中，我们发现了一个 env 基因，本研究以 env 基因位点为起始点，用生物信息学方法鉴定到一个小菜蛾内源性逆转录病毒元件 PxERV，并分析了该内源性逆转录病毒的序列结构，进一步对 env 基因检测分析，揭示了该内源性逆转录病毒的复制特性，有助于研究内源性逆转录病毒对小菜蛾的影响，为探究昆虫内源性逆转录病毒对宿主的生物学意义奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫及饲养

供试小菜蛾为实验室人工饲料饲养的 G88 品系和 2009 年福州野外采集后在实验室用萝卜苗继代饲养的福州敏感品系（FZ），饲养条件为温度 23 ~ 25℃，光周期为 16L∶8D。

1.2　小菜蛾 PxERV 的鉴定及序列结构分析

在小菜蛾精巢全转录组（数据未公布）分析中发现了一个基因（编号为 MSTRG. 10684），经预测发现该基因序列有 Baculo_F 保守结构域，属杆状病毒融合蛋白（Baculovirus F protein）家族，是一类糖蛋白，可能是内源性逆转录病毒的 env 基因。在小菜蛾基因组上以 PxERV 的 env 基因（编号为 MSTRG. 10684，克隆序列下载网址 http://iae.fafu.edu.cn/DBM/family/index.php）位点为起始点，上下游各以 10 kb 为窗口，用 LTR_Finder（Xu and Wang, 2007）鉴定 LTR 结构，确定 PxERV 的 DNA 序列；用 NCBI 工具 CD-Search 预测序列所包含的保守结构域；用 ORFfinder 预测 env 基因的开放阅读框。

1.3　PxERV 的 env 基因克隆

分别取小菜蛾福州敏感品系（FZ）成虫以及 G88 品系成虫（GA）和幼虫（GL）各 10 头，单头置于 1.5 mL 离心管中，液氮冷冻后，加钢珠高速破碎；用 DNeasy Bloodand Tissue Kit 试剂盒（QIAGEN）按照产品说明书提取小菜蛾基因组 DNA；分别用核酸蛋白测定仪和琼脂糖凝胶电泳对 DNA 浓度及完整性进行检测；样品于 -20℃保存。用 Primer Premier 在小菜蛾 PxERV 的 env 基因上下游设计克隆引物 S51_F/S51_R（表 1），由福州博尚生物技术有限公司合成，以小菜蛾基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，反应体系（25 μL）：2 × Hieff Canace Gold PCR Master Mix 12.5 μL，DNA 1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，ddH_2O 9.5 μL。反应程序：98℃ 3 min；98℃ 10 s，55℃ 20 s，72℃ 1 min，32 个循环；72℃ 5 min。反应结束后，将未纯化 PCR 产物送样，委托福州博尚生物技术有限公司进行基因测序。

表 1　引物信息

Table 1　Primer information

引物 Primer	引物序列（5′-3′） Primer sequence	用途 Use
S51_F	ATGAGAAAGGCAATGTCGC	基因克隆 Gene cloning
S51_R	CTACATACAGTGTAGGGATG	
10684. q_F	AACAACGGTAGGCATCTA	qPCR
10684. q_R	GTGGAATTGGTAAGGCTAA	
PxL32-F	CAATCAGGCCAATTTACCGC	
PxL32-R	CTGGGTTTACGCCAGTTACG	
PxEF1-F	GCCTCCCTACAGCGAATC	
PxEF1-R	CCTTGAACCAGGGCATCT	
10684gRNA-F	TAATACGACTCACTATAGGtaccgagaactcgtcaacaaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA	gRNA 合成 gRNA synthesis
10684gRNA-R	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCT	
10684. d-F	CTCGAGAGCTCACTTCTTACA	检测突变 Detecting mutation
10684. d-R	GTAACACACAACTTTAGATAAGCTC	

1.4　env 基因的系统发育分析

为探究小菜蛾 PxERV 的 env 与其他包膜糖蛋白的系统发育关系，我们从 NCBI 和果蝇数据库（Thurmond *et al*., 2019）下载了已知的 14 种昆虫内源性逆转录病毒 env 基因编码的氨基酸序列和 9 种昆虫核型多角体病毒（nucleopolyhedrovirus，NPVs）的 F 或 gp64 包膜糖蛋白序列，共 29 条；用 MEGA6（Tamura *et al*., 2013）的邻接法（Saitou and Nei，1987）对小菜蛾 PxERV 的 env 预测氨基酸序列与 29 条氨基酸序列进行了进化树分析。

1.5　qPCR 检测 env 基因表达

分别在 G88 品系小菜蛾 4 龄幼虫、蛹期第 0 天、

蛹期第 1 天、蛹期第 2 天和成虫期 5 个取样时间点进行取样,其中精巢样品各取样时间点每 50 头虫的精巢为 1 个重复,重复取样 3 次;虫体样品各取样时间点每 20 头剖去精巢的虫体为 1 个重复,重复取样 3 次。按照 Eastep Super 总 RNA 提取试剂盒(Promega, 北京)操作说明提取总 RNA。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪检测其完整性、纯度和浓度,然后以 1 μg 总 RNA 为模板,按照 GoScript Reverse Transcription System 试剂盒(Promega, 北京)合成 cDNA 第 1 链, -20℃保存。

以 1.3 节克隆得到的 env 基因序列为参考设计 qPCR 引物 10684.q_F/10684.q_R(表 1),以合成的 cDNA 为模板,以核糖体蛋白(PxL32)基因和延伸因子(PxEF1)基因为内参基因,引物序列见表 1,每个样品有 3 个技术重复,用 GoTaq qPCR Master Mix 试剂盒(Promega,北京)在仪器(CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System, C1000 Touch™ Thermal Cycler, Bio-Rad, 美国)上进行 PCR,测定 env 基因的表达情况。反应体系(20 μL):2 × Go Taq qPCR Master Mix 10 μL, ddH_2O 8 μL, cDNA 1 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL。反应程序:95℃ 2 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。

取两个内参基因 C_T 值的几何平均值为内参 C_T 值,用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$法(Livak and Schmittgen, 2001)计算基因相对表达量。

1.6 qPCR 检测 env 基因拷贝数

以 1.3 节提取的小菜蛾福州敏感品系(FZ)成虫以及 G88 品系成虫(GA)和幼虫(GL)基因组 DNA 为检测样本模板,以 1.5 节的 qPCR 方法测定 env 基因在上述样本基因组中的拷贝数。未添加 DNA 模板的对照的 C_T 值为 35,取 35 与相应样本 C_T 值的差值为该样本 env 基因拷贝数的量化值,进行不同样本间 env 基因拷贝数的比较分析。

1.7 CRISPR/Cas9 介导 env 基因突变

以 1.3 节克隆得到的小菜蛾 PxERV 的 env 基因序列为参考,在预测的 ORF 区设计 gRNA 引物 10684gRNA-F/10684gRNA-R(表 1),用 PCR 合成 gRNA 的 DNA 模板,反应体系(50 μL):DNA 合成酶 25 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 3 μL, ddH_2O 19 μL。反应程序:95℃ 3 min; 95℃ 15 s, 68℃ 15 s, 72℃ 20 s, 29 个循环; 72℃ 2 min。取 65 ng 上述 PCR 产物,加 2.5 μL NTP Mix 和 0.5 μL T7 RNA Mix(HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit, NEB),用 ddH_2O 补至 5 μL。37℃,12 h 合成 gRNA。取 400 ng 的 gRNA 与 250 ng 的 Cas9 蛋白(GenCrispr Cas9-N-NLS Nuclease, 金斯瑞)混匀, 37℃孵育 20 min;用显微注射仪对 260 颗 G88 品系小菜蛾产下 30 min 内的卵进行注射。G0 代成虫与野生型交配,F1 代开始一雌一雄自交,每代取单头成虫提 DNA(方法同 1.3 节),用检测引物 10684.d-F/10684.d-R(表 1)扩增检测片段,送样委托福州博尚生物技术有限公司进行测序。

1.8 数据分析

用 IBM SPSS Statistics 22 采用单因素方差进行基因相对表达量和拷贝数的差异分析,并进行 Tukey HSD[a] 显著性检验。

2 结果

2.1 PxERV 的序列结构分析及鉴定

以 PxERV 的 env 基因(编号为 MSTRG.10684)位点为起始点,上下游各以 10 kb 为窗口,发现上游 6 250 bp 处为 5′LTR,下游 1 824 bp 处为 3′LTR,长度约 268 bp。进一步的结构分析(图 1)发现,env 基因上游有由开放阅读框 *pol* 编码的蛋白酶(retro)、整合酶(rve)、RNA 酶 H(RNaseH)和逆转录酶(RT_LTR)4 种逆转录病毒蛋白结构域。综合分析结果,该 PxERV 元件全长 8 343 bp,有 *pol* 和 *env* 两个开放阅读框,不包含阅读框 *gag*,没有完整的逆转录病毒结构,符合昆虫内源性逆转录病毒 LTR-*pol*-*env*-LTR 结构(Misseri *et al*., 2004; Feng *et al*., 2018)。

2.2 env 基因克隆及分析

克隆得到 env 基因序列长 2 051 bp,预测最长 ORF 长约 1 617 nt,编码 538 个氨基酸。系统发育分析(图 2)发现,昆虫内源性逆转录病毒 env 基因的

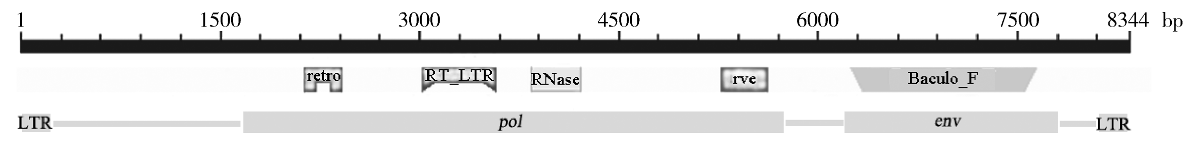


图 1 小菜蛾内源性逆转录病毒元件 PxERV 基因组结构示意图

Fig. 1 Genome structure of *Plutella xylostella* endogenous retroviral element PxERV

retro: 蛋白酶 Protease; RNase: RNA 酶 H Ribonuclease H; rve: 整合酶 Integrase; RT_LTR: 逆转录酶 Reverse transcriptase; Baculo_F: 包膜糖蛋白 F Envelope glycoprotein F.

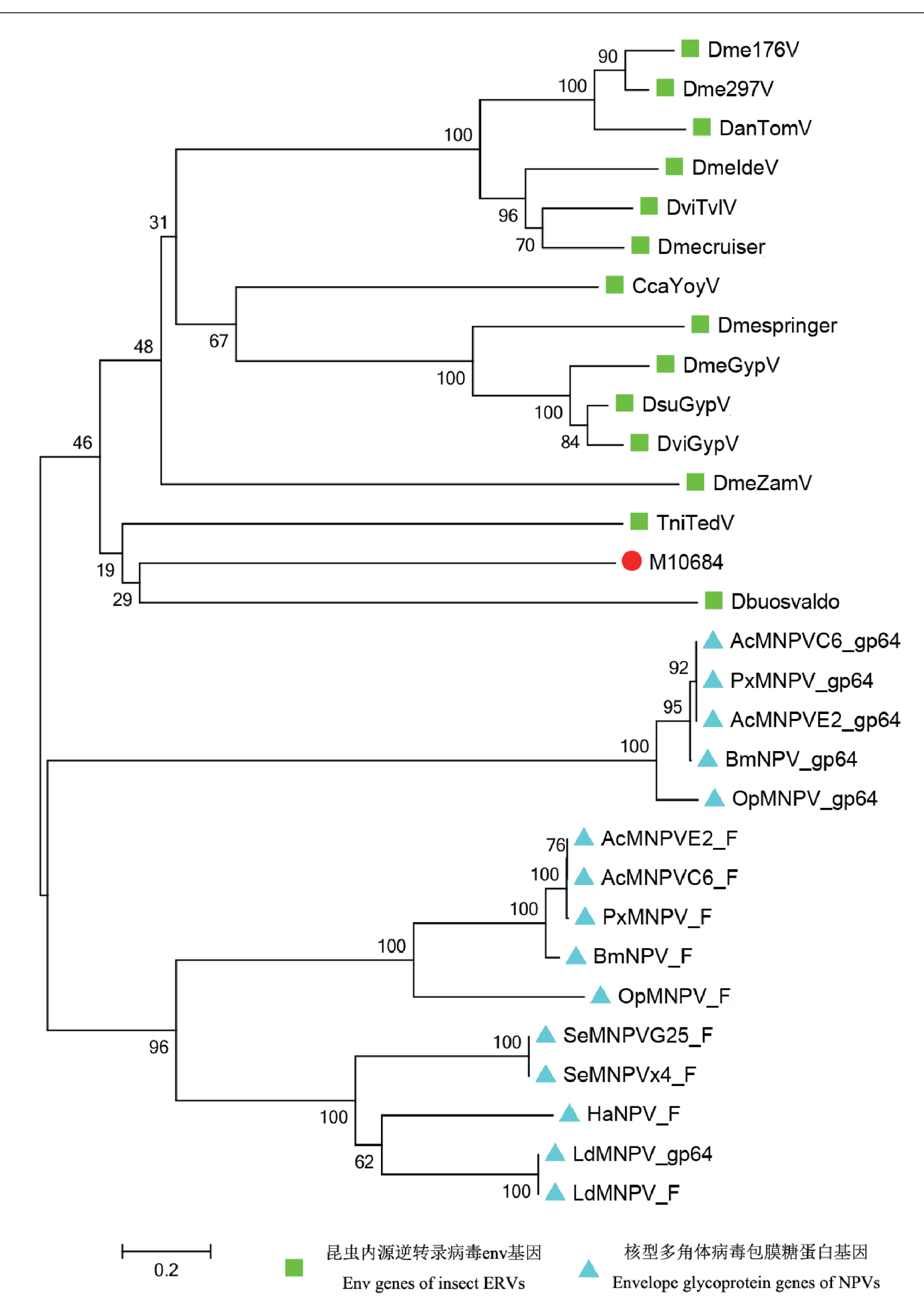


图 2 基于氨基酸序列构建的昆虫内源性逆转录病毒 env 基因编码的氨基酸序列与核型多角体病毒包膜糖蛋白系统发育树(邻接法，1 000 次重复)

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequences coded by env genes of endogenous retroviruses (ERVs) and envelope glycoproteins of nucleopolyhedroviruses (NPVs) of insects constructed based on the amino acid sequence (neighbor-joining method, 1 000 replicates)

昆虫内源性逆转录病毒 env 和核型多角体病毒包膜糖蛋白序列来源物种及其 GenBank 登录号 Source species of env proteins of ERVs and envelope glycoproteins of NPVs of insects and their GenBank accession numbers: DmeGypV: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, M12927; Dme176V: 黑腹果蝇 *D. melanogaster*, X01472; Dme297V: 黑腹果蝇 *D. melanogaster*, X03431; DmeZamV: 黑腹果蝇 *D. melanogaster*, AJ000387; DmeIdeV: 黑腹果蝇 *D. melanogaster*, AJ009736; DanTomV: 嗜凤梨果蝇 *D. ananassae*, Z24451; DsuGypV: 果蝇 *D. subobscura*, X72390; DviGypV: 黑果蝇 *D. virilis*, M38438; DviTvIV: 黑果蝇 *D. virilis*, AF056940; TniTedV: 粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*, M32662; CcaYoyV: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata*, U60529; Dmespringer: 黑腹果蝇 *D. melanogaster*, AF364549; Dmecruiser: 黑腹果蝇 *D. melanogaster*, AF364550; Dbuosvaldo: 果蝇 *D. buzzatii*, AJ133521; AcMNPVC6_gp64: 苜蓿银纹夜蛾 *Autographa californica*, L22858; AcMNPVC6_F: 苜蓿银纹夜蛾 *A. californica*, L22858; AcMNPVE2_gp64: 苜蓿银纹夜蛾 E2 核型多角体病毒 *A. californica*, KM667940; AcMNPVE2_F: 苜蓿银纹夜蛾 *A. californica*, KM667940; BmNPV_gp64: 家蚕 *Bombyx mori*, KJ186100; BmNPV_F: 家蚕 *B. mori*, KJ186100; OpMNPV_gp64: 黄杉合毒蛾 *Orgyia pseudotsugata*, U75930; OpMNPV_F: 黄杉合毒蛾 *O. pseudotsugata*, U75930; LdMNPV_gp64: 舞毒蛾 *Lymantria dispar*, KX618634; LdMNPV_F: 舞毒蛾 *L. dispar*, KX618634; SeMNPVx4_F: 甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, HG425345; SeMNPVG25_F: 甜菜夜蛾 *S. exigua*, HG425347; HaNPV_F: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, NC_003094; PxMNPV_gp64: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, DQ457003; PxMNPV_F: 小菜蛾 *P. xylostella*, DQ457003; M10684: 小菜蛾 *P. xylostella*, MSTRG. 10684.

蛋白氨基酸序列与昆虫核型多角体病毒(NPV)的包膜糖蛋白氨基酸序列明显分为两支;小菜蛾PxERV的env基因与果蝇 *Drosophila buzzatii* 的逆转座子osvaldo及粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 内源性逆转录病毒Ted的env基因进化关系最近。

2.3 env基因的表达

我们对5个发育时期的小菜蛾G88品系虫体和精巢中env基因的表达情况进行了qPCR检测,结果(图3)显示该env基因在成虫精巢中特异性高表达($P<0.05$),在其他发育时期的虫体和精巢之间表达量都没有显著差异($P>0.05$),但在成虫时期的虫体中比其他时期虫体中表达量稍高;在精巢中的表达量总体比在虫体中表达量稍高。

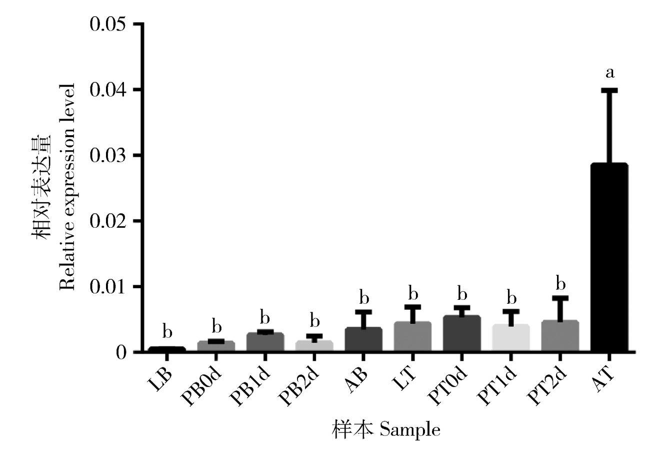


图3 env基因在小菜蛾G88品系不同发育阶段虫体和精巢中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of env gene in the body and testis of *Plutella xylostella* strain G88 at different developmental stages

LB:4龄幼虫虫体 Body of the 4th instar larva; PB0d:蛹期第0天虫体 Body of the 0-d-old pupa; PB1d:蛹期第1天虫体 Body of the 1-d-old pupa; PB2d:蛹期第2天虫体 Body of the 2-d-old pupa; AB:成虫期虫体 Adult body; LT:4龄幼虫精巢 Testis of the 4th instar larva; PT0d:蛹期第0天精巢 Testis of the 0-d-old pupa; PT1d:蛹期第1天精巢 Testis of the 1-d-old pupa; PT2d:蛹期第2天精巢 Testis of the 2-d-old pupa; AT:成虫期精巢 Adult testis. 图中数据为平均值±标准误;柱上不同小写字母表示基因表达量在不同发育时期的虫体和精巢间差异显著($P<0.05$, Tukey HSD[a]检验)。Data in the figure are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant differences in the gene expression level among insect bodies and testes at different developmental stages ($P<0.05$, Tukey HSD[a] test).

2.4 env基因在小菜蛾不同品系中的拷贝数

qPCR检测env基因表达情况时,G88品系成虫期精巢的生物学重复不太稳定,我们猜测可能是由于内源性逆转录病毒元件的拷贝数不同引起的。经检测(图4),env基因的拷贝数在小菜蛾不同品系个体间确实存在差异。另外,在福州敏感品系(FZ)个体中env基因的拷贝数显著少于G88品系个体中的拷贝数($P<0.05$),G88品系的幼虫期个体与成虫期个体中env基因拷贝数没有显著差异($P>0.05$)。

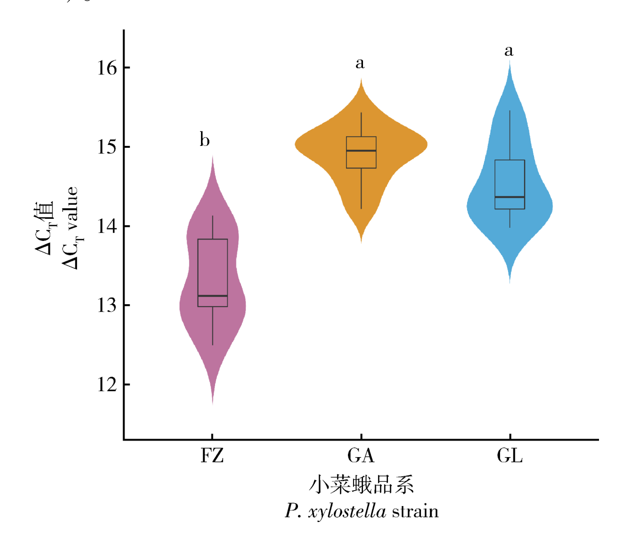


图4 env基因在小菜蛾不同品系和不同龄期的拷贝数

Fig. 4 Copy number of env gene in different stains and developmental stages of *Plutella xylostella*

未添加DNA模板的对照的C_T值为35,取35与相应样本C_T值的差值(ΔC_T值)为该样本env基因拷贝数的量化值。The C_T value of the control without DNA template was 35, and the difference between 35 and the C_T value (ΔC_T value) was taken to be the quantized value of the env gene copy number in this sample. FZ:福州敏感品系成虫 Adult of the susceptible strain from Fuzhou; GA:G88品系成虫 Adult of strain G88; GL:G88品系幼虫 Larva of strain G88. 不同小写字母表示拷贝数在不同样本间差异显著($P<0.05$, Tukey HSD[a]检验)。Different lowercase letters indicate significant differences in the gene copy number among different samples ($P<0.05$, Tukey HSD[a] test).

2.5 PxERV的独立复制活性

为探究内源性逆转录病毒的独立复制活性,我们利用CRISPR/Cas9技术共注射小菜蛾260颗卵,成活120头,送测G0代100头,突变率达60%,绝大多数突变虫自交后代的检测序列在突变区的同一位点有3种以上的碱基信号(图5:A),说明虫体中含多种突变类型;在送测小菜蛾中筛得1头只含在312和313位点有两碱基突变(图5:A)的雌虫,其后代连续自交、测序发现,F2代(图5:C)突变型碱基信号的峰高相对F1代(图5:B)变小,自交多代后无法测到突变型碱基信号,说明自交多代,突变型env基因在小菜蛾基因组上不断减少,直至消失,纯合野生型env基因恢复。

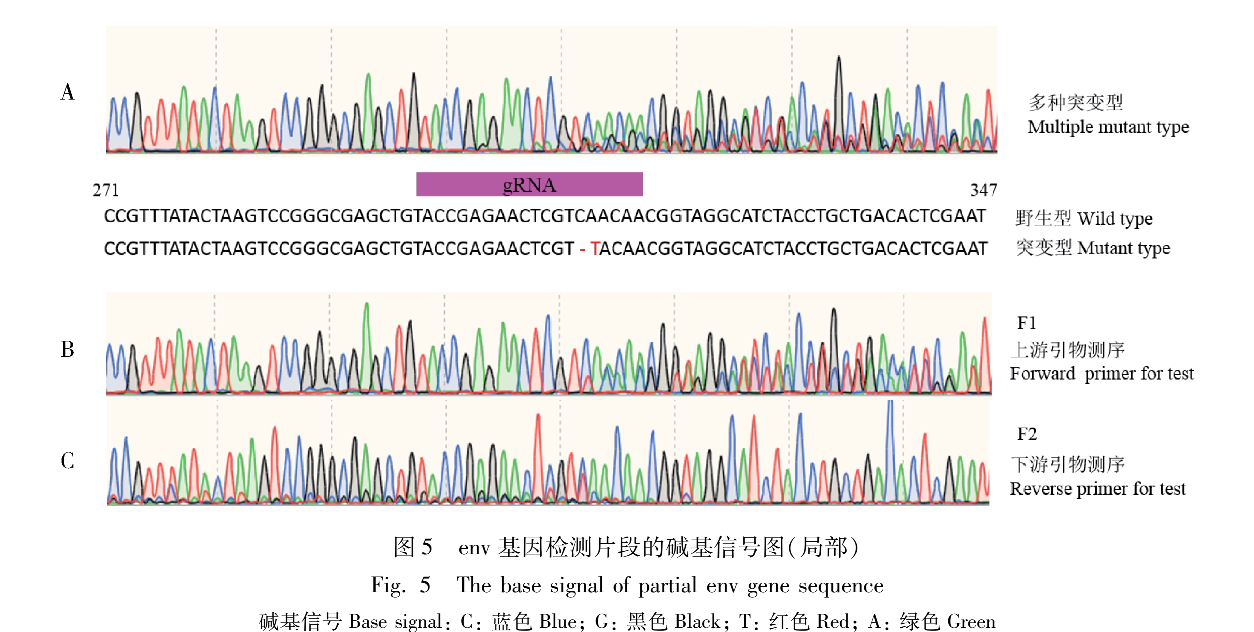


图 5　env 基因检测片段的碱基信号图(局部)

Fig. 5　The base signal of partial env gene sequence

碱基信号 Base signal：C：蓝色 Blue；G：黑色 Black；T：红色 Red；A：绿色 Green

3　讨论

本研究中，我们在小菜蛾基因组中发现了一个内源性逆转录病毒元件，长 8 343 bp，具有 LTR-*pol*-*env*-LTR 结构(图 1)。通常认为昆虫内源性逆转录病毒的侵染能力与 env 基因的表达相关(Teysset *et al*., 1998)，所以对内源性逆转录病毒 env 基因的特征分析，有利于全面了解该内源性逆转录病毒。

缺乏 env 基因的 LTR 转座子可以通过整合到杆状病毒的双链 DNA 基因组中从杆状病毒中“捕获”env 基因(Malik *et al*., 2000)。并且，还有报道发现与杆状病毒 Group Ⅱ 的融合蛋白具有显著同源性的昆虫内源性逆转录病毒的 env 蛋白有融合活性(Rohrmann and Karplus, 2001；Misseri *et al*., 2003, 2004)。杆状病毒家族有两类包膜糖蛋白，分别为 gp64 和 F。通常，杆状病毒 Group Ⅰ 含有 gp64 和 F 蛋白，而杆状病毒 Group Ⅱ 只含有 F 蛋白(Pearson and Rohrmann, 2002)。通过对昆虫内源性逆转录病毒 env 蛋白序列和几种昆虫核型多角体病毒的包膜糖蛋白序列比对及系统发育分析发现，昆虫内源性逆转录病毒 env 基因的蛋白序列与昆虫核型多角体病毒的包膜糖蛋白序列明显分为两支，符合内源性逆转录病毒是古外源逆转录病毒在宿主基因组中的残余这一猜想(Löwer *et al*., 1996)。本研究中的 PxERV 与粉纹夜蛾内源性逆转录病毒 Ted 和果蝇逆转座子 osvaldo 的 env 基因进化关系最近(图 2)，我们猜测 PxERV 可能在早期已整合到昆虫某祖先基因组中，世代留存并不断分化，或者在很早之前，PxERV 与 Ted 和 osvaldo 分别从某一种寄生在昆虫上的杆状病毒中“捕获”了同一段 env 基因。

昆虫内源性逆转录病毒 ZAM 属于 gypsy 家族，在果蝇的生殖系中可通过 RNA 中间体实现世代间的转移，其侵染性在果蝇的不同品系中是不一样的，造成拷贝数和插入位点有显著差异(Leblanc *et al*., 1997)。本研究 env 基因的突变检测发现同一虫体内可包含多种突变类型(图 5：A)，说明 PxERV 在小菜蛾基因组上是多拷贝存在的；突变后的 env 基因多代自交过程中在基因组上不断减少，最终恢复为野生型，说明 PxERV 在小菜蛾世代间有独立复制活性；env 基因拷贝数的量化检测发现 PxERV 在福州敏感品系(FZ)中的基因拷贝数低于在 G88 品系中的拷贝数，但 G88 品系不同发育龄期间的拷贝数没有显著差异(图 4)，说明 PxERV 在小菜蛾个体发育过程中不发生独立复制，并且独立复制能力在不同品系间有差异。另有研究发现 *ZAM* 的全长 RNA 与 gag 和 env 基因在卵母细胞周围的泡细胞中协同表达，组装成颗粒进入卵母细胞，从而实现 *ZAM* 在果蝇中的世代转染(Leblanc *et al*., 2000)。我们研究发现 PxERV 的 env 基因在成虫精巢中特异性高表达(图 3)，我们猜测 PxERV 可能是在成虫精巢中进行独立复制，通过小菜蛾雄性生殖系统完成世代侵染。这一猜测还需进一步的验证，其世代侵染的分子机制也需进一步的研究。

本研究发现了一个小菜蛾内源性逆转录病毒元件，揭示了它有独立的复制活性，为进一步研究内源

性逆转录病毒对小菜蛾的影响奠定了基础,也促进了昆虫内源性逆转录病毒领域的研究,有利于研究内源性逆转录病毒对宿主的生物学意义。

参考文献(References)

Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, Talbot G, Paces J, Burt A, Tristem M, 2004. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(14): 4894–4899.

Bustamante Rivera YY, Brütting C, Schmidt C, Volkmer I, Staege MS, 2017. Endogenous retrovirus 3-history, physiology, and pathology. *Front. Microbiol.*, 8: 2691.

Fablet M, 2014. Host control of insect endogenous retroviruses: small RNA silencing and immune response. *Viruses*, 6(11): 4447–4464.

Feng M, Wang X, Ren F, Zhang N, Zhou Y, Sun J, 2018. Genome-wide characterization of endogenous retroviruses in *Bombyx mori* reveals the relatives and activity of env genes. *Front. Microbiol.*, 9: 1732.

Furlong M, Wright J, Dosdall L, 2013. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 517–541.

Garcia-Etxebarria K, Jugo B, 2010. Genome-wide detection and characterization of endogenous retroviruses in *Bos taurus*. *J. Virol.*, 84(20): 10852–10862.

Garcia-Etxebarria K, Jugo B, 2016. Genome-wide reexamination of endogenous retroviruses in *Rattus norvegicus*. *Virology*, 494: 119–128.

Kim A, Terzian C, Santamaria P, Pélisson A, Purd′homme N, Bucheton A, 1994. Retroviruses in invertebrates: the gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(4): 1285–1289.

Leblanc P, Desset S, Dastugue B, Vaury C, 1997. Invertebrate retroviruses: *ZAM* a new candidate in *D. melanogaster*. *EMBO J.*, 16(24): 7521–7531.

Leblanc P, Desset S, Giorgi F, Taddei A, Fausto A, Mazzini M, Dastugue B, Vaury C, 2000. Life cycle of an endogenous retrovirus, *ZAM*, in *Drosophila melanogaster*. *J. Virol.*, 74(22): 10658–10669.

Livak K, Schmittgen T, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Löwer R, Löwer J, Kurth R, 1996. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(11): 5177–5184.

Malik H, Henikoff S, Eickbush T, 2000. Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res.*, 10(9): 1307–1318.

Misseri Y, Cerutti M, Devauchelle G, Bucheton A, Terzian C, 2004. Analysis of the *Drosophila gypsy* endogenous retrovirus envelope glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 85(Pt 11): 3325–3331.

Misseri Y, Labesse G, Bucheton A, Terzian C, 2003. Comparative sequence analysis and predictions for the envelope glycoproteins of insect endogenous retroviruses. *Trends Microbiol.*, 11(6): 253–256.

Pearson M, Rohrmann G, 2002. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. *J. Virol.*, 76(11): 5301–5304.

Rohrmann G, Karplus P, 2001. Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. *BMC Evol. Biol.*, 1: 1.

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406–425.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.

Terzian C, Pélisson A, Bucheton A, 2001. Evolution and phylogeny of insect endogenous retroviruses. *BMC Evol. Biol.*, 1: 3.

Teysset L, Burns J, Shike H, Sullivan B, Bucheton A, Terzian C, 1998. A Moloney murine leukemia virus-based retroviral vector pseudotyped by the insect retroviral *gypsy* envelope can infect *Drosophila* cells. *J. Virol.*, 72(1): 853–856.

Thurmond J, Goodman J, Strelets V, Attrill H, Gramates L, Marygold S, Matthews B, Millburn G, Antonazzo G, Trovisco V, Kaufman T, Calvi B, Perrimon N, Gelbart S, Agapite J, Broll K, Crosby L, dos Santos G, Emmert D, Falls K, Jenkins V, Sutherland C, Tabone C, Zhou P, Zytkovicz M, Brown N, Garapati P, Holmes A, Larkin A, Marygold S, Pilgrim C, Urbano P, Czoch B, Goodman J, Thurmond J, Cripps R, Baker P, Consortium F, 2019. FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Res.*, 47(Database issue): D759–D765.

Wang Z, Qu L, Yao J, Yang X, Li G, Zhang Y, Li J, Wang X, Bai J, Xu G, Deng X, Yang N, Wu C, 2013. An EAV-HP insertion in 5′ flanking region of *SLCO1B3* causes blue eggshell in the chicken. *PLoS Genet.*, 9(1): e1003183.

Xu Z, Wang H, 2007. LTR_FINDER: an efficient tool for the prediction of full-length LTR retrotransposons. *Nucleic Acids Res.*, 35(Web Server issue): W265–W268.

(责任编辑:马丽萍)